

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
31. Januar 2002 (31.01.2002)

PCT

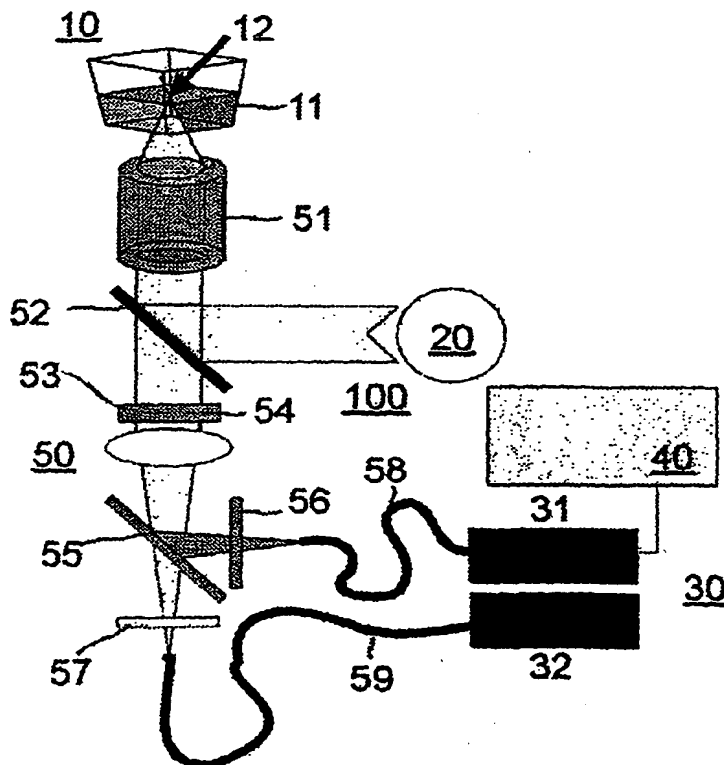
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 02/08732 A1**

- (51) Internationale Patentklassifikation: **G01N 21/64** (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V.** [DE/DE]; Hofgartenstrasse 8, 80539 München (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: **PCT/EP01/08328**
- (22) Internationales Anmeldedatum: 18. Juli 2001 (18.07.2001) (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **HEINZE, Katrin** [DE/DE]; Untere Maschstrasse 23, 37073 Göttingen (DE). **SCHWILLE, Petra** [DE/DE]; Angerstrasse 12 A, 37073 Göttingen (DE). **KOLTERMANN, Andre** [DE/DE]; Baumschulenweg 5, 37083 Göttingen (DE). **KETTLING, Ulrich** [DE/DE]; Stumpfe Eiche 2, 37077 Göttingen (DE).
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität: 100 35 190.5 20. Juli 2000 (20.07.2000) DE (74) Anwalt: **HERTZ, Oliver**; V. Bezold & Sozien, Akademiestrasse 7, 80799 München (DE).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD AND DEVICE FOR MULTICOLOUR 2-PHOTON FLUORESCENCE COINCIDENCE ANALYSIS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUR MEHRFARBEN 2-PHOTONEN-FLUORESCENZ-KOINZIDENZANALYSE



(57) Abstract: The invention relates to a method for fluorescence measurement of sample analytes which are marked by different fluorescent markers having spectrally different fluorescence emissions. Said method consists of the following steps: the sample (11) is illuminated in a measuring volume by a laser (20) for exciting the fluorescence emission of the at least two fluorescent markers, the sample in the measuring volume being illuminated by one individual laser line at the most with such a high excitement intensity that the fluorescent markers are excited together by means of 2-photon absorption. The fluorescence emissions are detected by at least two detection devices (31, 32) which are designed to detect light in different spectral areas according to the spectral fluorescence properties of the fluorescent markers. A cross-correlation and/or a coincidence analysis of the detector signals from the detection devices is carried out. The invention also relates to a measuring device for carrying out the above-mentioned method.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]



WO 02/08732 A1



(81) **Bestimmungsstaaten (national):** AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) **Bestimmungsstaaten (regional):** ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),

OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Veröffentlicht:**

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

---

(57) **Zusammenfassung:** Es wird ein Verfahren zur Fluoreszenzmessung an mit unterschiedlichen, spektral verschiedene Fluoreszenzemissionen aufweisenden Fluoreszenzmarkern markierten Analyten in einer Probe mit den folgenden Schritten beschrieben: Beleuchtung der Probe (11) in einem Messvolumen mit einem Laser (20) zur Anregung der Fluoreszenzemission der mindestens zwei Fluoreszenzmarker, wobei die Beleuchtung der Probe im Messvolumen mit maximal einer einzelnen Laserlinie mit einer derart hohen Anregungsintensität erfolgt, dass die Fluoreszenzmarker gemeinsam durch 2-Photonen-Absorptionen angeregt werden, Detektion der Fluoreszenzemission mit mindestens zwei Detektoreinrichtungen (31, 32), die zur Lichtdetektion in verschiedenen Spektralbereichen entsprechend den spektralen Fluoreszenzeigenschaften der Fluoreszenzmarker ausgelegt sind, und Durchführung einer Kreuzkorrelations- und/oder eine Koinzidenzanalyse von Detektorsignalen der Detektoreinrichtungen (31, 32). Es wird auch eine Messvorrichtung zur Durchführung des Verfahrens beschrieben.

## VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUR MEHRFARBEN-2-PHOTONEN-FLUORESZENZ-KOINZIDENZANALYSE

(

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Fluoreszenz-Korrelationsanalyse, insbesondere Verfahren zur Koinzidenz- oder Kreuzkorrelationsanalyse an mit mindestens zwei unterschiedlichen Fluoreszenzmarkern markierten Analyten in einer Probe, und Messeinrichtungen zur Durchführung der genannten Verfahren.

Die Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie (FCS) ist als höchstempfindliches optisches Verfahren zum Nachweis von dynamischen Eigenschaften einzelner Moleküle oder Molekülverbindungen oder von geringsten Konzentrationen fluoreszierender Substanzen allgemein bekannt. Bei einem herkömmlichen Fluoreszenz-Korrelationsspektrometer wird mit einem Mikroskop ein Laserstrahl in die Probe eingekoppelt und auf ein Messvolumen von ca.  $10^{-15}$  l (1 fl) fokussiert. Das Messvolumen ist so klein, dass sich im zeitlichen Mittel weniger als ein fluoreszierendes Molekül darin befindet. Die Fluoreszenz der interessierenden Probenmoleküle wird durch eine Korrelationsanalyse der Detektorsignale erfasst. Das Mikroskop ist zur dreidimensionalen Positionierung des Messvolumens ausgelegt, wie dies z. B. mit einem Konfokalmikroskop möglich ist.

Bei der Konfokalspektroskopie wird ein Laserstrahl zur Fluoreszenzanregung auf einen beugungsbegrenzten Punkt in der Probe fokussiert. Eine Punktblende (sog. „Pinhole“) in der Bildebene, in der der Anregungspunkt abgebildet ist, dient als Feldblende, mit der Fluoreszenz und Streulicht, das von Orten außerhalb des Fokus ausgeht, ausgeblendet wird. Die Beobachtung einzelner Moleküle im Messvolumen wird durch die dynamischen Moleküleigenschaften (Diffusionskoeffizient) in der Pro-

be bestimmt. Um in der zur Verfügung stehenden kurzen Messzeit für ein annehmbares Signal-Rausch-Verhältnis genügend Photonen zu detektieren, müssen bei der herkömmlichen Konfokalspektroskopie relativ hohe Anregungsintensitäten (im Bereich von ca.  $100 \text{ kW/cm}^2$ ) verwendet werden. Dies ist jedoch problematisch, da die Stabilität der üblicherweise verwendeten Markierungsfarbstoffe (z. B. Fluorescein-, Rhodamin- und Cyanin-Derivate) beschränkt ist.

Eine Weiterentwicklung des FCS-Verfahrens für heterogene Systeme, in denen molekulare Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Analyten beobachtet werden sollen, wird in WO 99/34195 mit der Zweifarben-Kreuzkorrelationsanalyse beschrieben. Bei diesem Verfahren werden mindestens zwei Fluoreszenzfarbstoffe an einen oder mehrere Analyten als Marker gebunden. Die Fluoreszenzfarbstoffe sind so gewählt, dass sie spektral verschiedene Fluoreszenzmaxima besitzen. In einem Messaufbau, der schematisch in Figur 9 illustriert ist, werden die Farbstoffe mit zwei Lasern 21', 22', die auf die jeweiligen Farbstoffabsorptionen abgestimmt sind, angeregt. Mit zwei spektral auf die verschiedenen Fluoreszenzmaxima abgestimmten Detektoren 31', 32' wird die Fluoreszenzemission aus der Probenkammer 10' erfasst. Die Detektorsignale werden einer Kreuzkorrelations- oder Koinzidenzanalyse unterzogen. Die Konzentration der Probe und die Größe des Messvolumens sind so gewählt, dass zu einem Messzeitpunkt im Messvolumen höchstens ein Molekül vorhanden ist. Durch Auswertung von zeitlichen Korrelationen oder Koinzidenzen in den Detektorsignalen kann erfasst werden, ob sich zum Messzeitpunkt ein Analyt mit dem einen oder anderen oder beiden Markierungsfarbstoffen im Messvolumen befunden hat. Mit der Zweifarben-Korrelationsanalyse können molekulare Assoziations- oder Dissoziationsvorgänge, wie z. B. die Bildung oder das Aufbrechen von chemischen Bindungen, in Echtzeit gemessen werden.

Die Zweifarben-Technik gemäß WO 99/34195 besitzt aber auch Nachteile, die die Anwendbarkeit und die Genauigkeit des Verfahrens einschränken. Zur Anregung der Fluoreszenzemissionen der Markierungsfarbstoffe sind gewöhnlich verschiedene Laser 21', 22' erforderlich, deren Foci zeitlich stabil und mit einer Genauigkeit von Bruchteilen eines Femtoliters an einem Messpunkt gebildet werden müssen. Es ist ein erheblicher experimenteller Aufwand zur Justierung und Stabilisierung der Anregungslaser erforderlich. Des Weiteren muss das Abbildungssystem zur Erzielung einer genügenden Ortsauflösung in Bestrahlungsrichtung (z-Richtung) abbildungsseitig ein Pinhole vorgesehen sein, auf das das Messvolumen abgebildet wird. Eine weitere Beschränkung betrifft die verfügbaren Farbstoffsysteme. Die Markierungsfarbstoffe müssen bei allen Anregungswellenlängen eine hohe Lichtstabilität besitzen. Außerdem müssen die verwendeten Markierungsfarbstoffe hohe Quantenausbeuten aufweisen.

Von W. Denk et al. wird in „Science“, 1990, Band 248, Seite 73 ff. ein Verfahren zur Scanning-Fluoreszenzmikroskopie mit 2-Photonen-Laseranregung beschrieben. Es wurde festgestellt, dass bei 2-Photonen-Anregung Lichtschäden an den Markierungsfarbstoffen und auch lichtinduzierte Zerstörungen der Zellumgebung in biologischen Proben vermieden werden. Allerdings erfordert die 2-Photonen-Anregung extrem hohe Photonen-Flussdichten der Größenordnung von  $10^{31}$  Photonen/cm<sup>2</sup>, um die gleichzeitige Absorption von zwei Photonen innerhalb des Wirkungsquerschnittes der Farbstoffmoleküle zu bewirken. Die 2-Photonen-Anregung war bisher auf die Scanning-Mikroskopie beschränkt.

Die Aufgabe der Erfindung ist es, ein verbessertes Verfahren zur Fluoreszenzmessung auf der Basis einer Kreuzkorrelations- und/oder Koinzidenzanalyse anzugeben, mit dem die Nachteile insbesondere der herkömmlichen Zweifarben-Technik vermieden

werden. Das erfindungsgemäße Verfahren soll mit einem vereinfachten Messaufbau realisiert werden, ohne dass Einschränkungen in bezug auf die Genauigkeit und Stabilität hingenommen werden müssen. Die Aufgabe der Erfindung ist es auch, verbesserte Korrelations- und/oder Koinzidenzmessvorrichtungen zur Fluoreszenzmessung mit einem vereinfachten Aufbau anzugeben.

Diese Aufgaben werden mit einem Verfahren und einer Vorrichtung zur Fluoreszenzmessung mit den Merkmalen gemäß dem Patentansprüchen 1 bzw. 9 gelöst. Vorteilhafte Ausführungsformen und Anwendungen der Erfindung ergeben sich aus den abhängigen Ansprüchen.

Die Grundidee der Erfindung ist es, zur Korrelations-Fluoreszenzmessung an Analyten mit mindestens zwei Fluoreszenzmarkern auf einem oder mehreren zu analysierenden Stoffen die Probe mit einer derart hohen Anregungsintensität (Photonenflussdichte) zu beleuchten, dass die Fluoreszenzanregung der Fluoreszenzmarker durch 2-Photonen-Absorptionen erfolgt. Die Probe wird vorzugsweise mit einer einzigen Laserlinie beleuchtet. Der Laserstrahl wird in die Probe an dem gewünschten Ort des Messvolumens fokussiert. Die Fluoreszenzmarker werden simultan bei einer gemeinsamen Anregungswellenlänge angeregt, besitzen aber spektral getrennte Fluoreszenzemissionen, die mit verschiedenen Detektoren erfasst werden. Die Signale der Detektoren werden einer Korrelationsanalyse (Koinzidenz- oder Kreuzkorrelationsanalyse) unterzogen. Die 2-Photonen-Anregung von Fluoreszenzmarkern besitzt den Vorteil, dass Fluoreszenzmarker verwendet werden können, die ähnliche Maxima in den Anregungsspektren der 2-Photonen-Anregung besitzen, sich jedoch durch verschieden starke Stokes-Verschiebungen der Emission auszeichnen.

Die Fluoreszenzmessung ist auf eine einzelmolekülbasierende Analyse gerichtet, bei der das Mess- oder Beobachtungsvolumen

so klein ist, dass Fluoreszenzfluktuationen von einzelnen Molekülen detektiert und ausgewertet werden können.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Messverfahrens werden Fluoreszenzmarker (insbesondere Fluoreszenzfarbstoffe) verwendet, die sich überlappende Anregungsspektren der 2-Photonen-Absorption besitzen. Die Anregung der Fluoreszenzmarker für die Korrelations-Fluoreszenzmessung erfolgt vorzugsweise bei einer Anregungswellenlänge, bei der beide Fluoreszenzmarker eine im wesentlichen gleiche Fluoreszenzphotonenausbeute nach 2-Photonen-Absorption aufweisen. Da die Fluoreszenzphotonenausbeute, definiert als die Zählrate, die pro Zeiteinheit und pro Molekül detektiert wird, insbesondere von den Umgebungsbedingungen (zum Beispiel Absorptionszustand der Fluoreszenzmarker, Lösungsmittel und dergleichen) abhängt, wird vorzugsweise vor der Fluoreszenzmessung ein Vorversuch zur Ermittlung der optimalen Anregungswellenlänge durchgeführt. Der Vorversuch erfolgt einmalig für ein bestimmtes Messsystem oder mehrfach vor jeder Fluoreszenzmessung.

Erfindungsgemäß ergibt sich eine erhebliche Vereinfachung des Messaufbaus. Die Vereinfachung besteht erstens darin, dass nur ein Laser zur Anregung benutzt werden muss. Eine weitere Vereinfachung des experimentellen Aufbaus ist gegeben, da das Anregungsvolumen der 2-Photonen-Anregung in Ausbreitungsrichtung des Laserstrahls (z-Richtung) gegenüber dem Anregungsvolumen bei 1-Photon-Anregung verkleinert wird. Die Wahrscheinlichkeit der 2-Photonen-Absorption ist vom Quadrat der Anregungsintensität abhängig. Der Absorptionsquerschnitt verringert sich deshalb für 2-Photonen-Absorptionsprozesse außerhalb der Fokalebene in z-Richtung proportional zu  $z^{-4}$ . Es ergibt sich eine inhärente Konzentration der Anregung auf die Fokalebene. Es ist nicht zwingend erforderlich, das Messvolumen auf ein Pinhole abzubilden, da außerhalb der Fokalebene ohnehin kein Flu-

oreszenzlicht in den interessierenden Spektralbereichen emittiert wird.

Ein weiterer wichtiger Vorteil der 2-Photonen-Anregung gemäß der Erfindung besteht in der hohen Toleranz biologischer Materialien (Zellen, Zellbestandteile oder Zellverbunde) gegenüber Infrarotstrahlung. Zur Anregung einer Fluoreszenzemission im sichtbaren Spektralbereich durch 2-Photonen-Absorption ist es ausreichend, wenn mit Laserlicht im roten oder nahen infraroten Spektralbereich angeregt wird. Aufgrund der langwelligen Anregung ergibt sich ein weiterer Vorteil für das Signal-Rausch-Verhältnis, da Anregungs- und Emissionslicht spektral weit voneinander getrennt sind, so dass störendes Streulicht weitestgehend durch optische Filter unterdrückt werden kann, ohne einen Teil des zu detektierenden Emissionslichts einzubüßen. Ein weiterer Vorteil hierbei ist die Reduktion von Falschlicht, was hauptsächlich die Fluoreszenz von Verunreinigungen ("Schmutz") betrifft. Diese Fluoreszenz ist im wesentlichen im kurzwelligen sichtbaren Bereich, also im Fall von 1-Photonen-Anregung kritisch. Bei einer langwelligen 2-Photonen-Anregung werden solche Verunreinigungen mit deutlich geringerer Effizienz angeregt, so dass hierdurch das Signal-zu-Rausch-Verhältnis - verglichen zur 1-Photonen-Anregung - deutlich höher liegt.

Gegenstand der Erfindung ist auch eine Messvorrichtung zur Fluoreszenzmessung an Analyten mit mindestens zwei unterschiedlichen Fluoreszenzmarkern, bei der die Beleuchtungseinrichtung durch eine einzelne Laserlinie gebildet wird, die zur Anregung von 2-Photonen-Absorptionen der Fluoreszenzmarker ausgelegt ist. Ein weiteres wichtiges Merkmal der erfindungsgemäßen Vorrichtung besteht in der Bereitstellung von zwei Detektoreinrichtungen, die zur Detektion der Fluoreszenzemission in verschiedenen Spektralbereichen eingerichtet sind und auf die das gesamte, von der Probe (insbesondere vom Anregungsvo-



lumen und auch aus der Umgebung des Anregungsvolumens) ausgehende Fluoreszenzlicht abgebildet wird. Die Detektion erfolgt blendenfrei, eine Pinhole-Blende ist nicht vorgesehen. Es ist eine nicht-konfokale Abbildung des Anregungsvolumens auf die Detektoren vorgesehen.

Durch die 2-Photonen-Anregung mit einem einzelnen Laser wird nicht nur der Geräteaufwand reduziert. Es ergeben sich auch Vorteile für die optische Justierung. Das Problem von Größe und Überlappung von Anregungsvolumen ist ausgeschlossen. Zusätzliche Detektionsblenden sind nicht erforderlich. Werden Fluoreszenzfarbstoffe als Marker verwendet, so ergibt sich als weiterer Vorteil die Tatsache, dass nach der 2-Photonen-Anregung praktisch keine Triplet-Zustände eingenommen werden, so dass keine Signalverluste über die Triplet-Bildung erfolgen.

Das Anregungsvolumen ist beim erfindungsgemäßen Messverfahren kleiner als bei der herkömmlichen 1-Photon-Anregung. Dies ermöglicht, Messungen bei höheren Probenkonzentrationen von ungefähr 100 nM durchzuführen, was Vorteile für die weitere Bewertung der Ergebnisse besitzt. Es können aber auch Konzentrationen im nM-Bereich ermittelt werden. Es werden kurze Analysezeiten im Bereich von einer oder wenigen Sekunden ermöglicht. Es werden Messungen in lebenden Zellen ermöglicht, die die genaue Bestimmung von Kinetiken und Konzentrationen doppelt markierter Moleküle oder Komplexe erlaubt.

Wichtige Merkmale der Erfindung bestehen darin, dass nur ein Anregungsvolumenelement gegeben ist, da zwei verschiedene Fluorophore monochromatisch mittels 2-Photonenanregung auf Einzelmolekülbasis angeregt werden. Die 2-Photonenanregung bietet insbesondere die folgenden Vorteile: es ist ein physikalisch perfektes Überlappen der Anregungsvolumenelemente für beide Fluorophore gegeben. Das Anregungsvolumenelement kann gegen-

über herkömmlichen Verfahren verkleinert werden, d. h. es sind Messung von höheren Konzentrationen (100 nM und höher) ist möglich. Es erfolgt eine Detektion ohne Pinhole (Anregungsvolumenelement ist durch 2-Photonenanregung klein genug). Es wird eine Multi-Color-Detektion von drei oder mehr Fluorophoren auf Einzelmolekülbasis möglich, d. h. es kann eine monochromatische Anregung über 2-Photonen bei z. B.  $> 800$  nm und eine Detektion von verschiedenen Fluorophoren von 300 bis  $< 800$  nm erfolgen, ohne das in diesem Bereich störende Anregungswellenlängen liegen, wie es bei der CW-Anregung notwendig ist. Es werden Messungen von Molekülen, insbesondere von Molekülkomplexen mit drei oder mehr Komponenten, ermöglicht.

Weitere Vorteile und Einzelheiten der Erfindung werden aus der folgenden Beschreibung der beigefügten Zeichnungen ersichtlich. Es zeigen:

- Figur 1                    eine schematische Übersichtsdarstellung einer erfindungsgemäßen Messvorrichtung,
- Figur 2                    eine Illustration von molekularen Vorgängen, die mit Vorteil mit der erfindungsgemäße Korrelationsmessung erfassbar sind,
- Figur 3                    Kurvendarstellungen der spektralen Eigenschaften von Markierungsfarbstoffen,
- Figuren 4, 5              Messergebnisse zur Illustration der Quantenausbeute von Markierungsfarbstoffen in Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge und der Anregungsleistung,
- Figuren 6, 7              Kurvendarstellungen zur Illustration der Genauigkeit und Selektivität der erfindungsgemäßen Korrelationsmessung,

Figur 8                    Kurvendarstellungen eines erfindungsgemäß beobachteten enzymatischen Abbaus einer Substanz, und

Figur 9                    eine schematische Übersichtsdarstellung einer herkömmlichen Messvorrichtung zur Zweifarben-Korrelationsmessung (Stand der Technik)

Die Erfindung wird im Folgenden unter Bezug auf 2-Photonen-Anregungen in Testsystemen mit zwei Fluoreszenzmarkern beschrieben. Entsprechende Umsetzungen der Erfindung ergeben sich bei Mehr-Farben-Anwendungen. Es können drei oder mehr geeignete Fluorophore mit einer einfarbigen 2-Photonen-Anregung zur Emission angeregt werden. Dies erlaubt die Vermessung komplexer molekularer und zellulärer Prozesse, an denen mehr als zwei Analyte beteiligt sind.

Der optische Aufbau eines 2-Photonen-Fluoreszenzkorrelations-spektrometers gemäß der Erfindung ist schematisch in Figur 1 illustriert. Das Spektrometer 100 umfasst eine Probenkammer 10, eine Beleuchtungseinrichtung 20, eine Detektoreinrichtung 30, einen Korrelator 40 und ein Abbildungssystem 50. Das Abbildungssystem 50 wird vorzugsweise durch einen invertierten Mikroskopaufbau (z. B. mit einem Olympus IX70-Mikroskop) gebildet. Die Probenkammer 10 ist ein anwendungsabhängig gewähltes Behältnis, in dem die Probe 11 ruhend oder strömend angeordnet ist. Die Probe 11 ist eine Lösung oder Suspension der zu untersuchenden Substanzen oder Partikel. Es kann vorgesehen sein, dass die Probenkammer 10 in einer oder mehreren Raumrichtungen beweglich angeordnet ist. Die Beweglichkeit der Probenkammer kann sich erstens auf eine Scan-Bewegung relativ zum Abbildungssystem 50 zur Aufnahme dreidimensionaler Abbildungen, z. B. dreidimensionaler Konzentrationsverteilungen in der Probe, beziehen. Ferner ist es möglich, der Probenkammer

10 eine periodische Modulationsbewegung aufzuprägen, wie es in WO 99/34195 beschrieben ist. Die zum Abbildungssystem 50 weisende Wand der Probenkammer 10 besitzt eine derart geringe Dicke, dass der Fokus 12 des Anregungslichts mit einem geringen Abstand von ca. 400 bis 500  $\mu\text{m}$  vom Objektiv 51 gebildet werden kann. Die entsprechende Wand besitzt vorzugsweise die Dicke eines Deckglases, wie es in der Mikroskopie verwendet wird. Die Dicke beträgt bspw. ca. 150 bis 190  $\mu\text{m}$ .

Die Beleuchtungseinrichtung 20 ist ein einzelner Laser, der für die 2-Photonen-Anregung der jeweils verwendeten Fluoreszenzmarker ausgelegt ist. Bei der Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen wird vorzugsweise ein durchstimmbarer Puls laser verwendet, wie z. B. ein modengekoppelter Tsunami Ti:Saphier-Laser (Hersteller: Spectra Physics, Mountain View, CA, Pulsfrequenz 80 MHz, Pulsbreite 100 fs, Durchstimmbbarkeit zwischen 700 und 1000 nm). Das parallele Laserlicht wird über den dichroitischen Spiegel 52 (z. B. vom Typ 710 DCSPXR, AHF Analysetechnik, Tübingen, Deutschland) in das Objektiv 51 gelenkt (z. B. 60 x 1.2-Objektiv UplanApo Olympus) und in der Probenkammer 10 fokussiert. Aus Kalibrierungsmessungen sind die Dimensionen des Anregungsvolumens  $r_0$  und  $z_0$  in der Fokalebene bekannt. Der Durchmesser des Fokus in der Fokalebene beträgt z. B.

$r_0 = 0.48 \mu\text{m}$ . Mit einem Verhältnis  $r_0/z_0 = 2.8$  ergibt sich ein wirksames Anregungs-Volumenelement von ungefähr 0.4 fl.

In diesem Anregungsvolumen wird je nach Anwesenheit von Fluoreszenzmarkern eine Fluoreszenzemission angeregt, die über das Objektiv 51, den dichroitischen Spiegel 52, einen Emissionsfilter 53 (z. B. vom Typ 600 DF 200, AHF Analysetechnik) zur Unterdrückung des Anregungslichts und eine Optik 54 auf einen zweiten dichroitischen Spiegel 55 (z. B. vom Typ 595 DCLP, AHF Analysetechnik) gerichtet wird. Am zweiten dichroitischen Spiegel 55 wird der kurzwellige Teil des Fluoreszenzlichtes reflektiert und durch einen Bandpassfilter 56 auf den langwel-

ligen Detektor 31 der Detektoreinrichtung gerichtet. Das am dichroitischen Spiegel durchgelassene Fluoreszenzlicht wird ebenfalls gefiltert (Kantenfilter 57) und auf den kürzerwelligen Detektor 32 gerichtet. Die Einkopplung in die Detektoren erfolgt mit Lichtleitfasern 58 bzw. 59. Die Detektoren sind bspw. Avalanche-Photodioden (Typ: SPCM-200, EG & G Optoelectronics, Kanada). Die optischen Einkoppelfasern besitzen einen Durchmesser von 100  $\mu\text{m}$  und sind einzelnen in allen drei Raumrichtungen justierbar. Die Detektoren 31, 32 sind mit einem Korrelator 40 verbunden. Als Korrelator wird bspw. eine Korrelatorkarte (Typ: ALV-5000, Hersteller LAV Langen, Deutschland) verwendet. Abweichend vom in Figur 1 gezeigten Aufbau kann auch auf die Einkoppelfasern verzichtet und das Fluoreszenzlicht direkt auf die Detektoren abgebildet werden. Der optische Aufbau kann zusätzlich zur Aufnahme von konfokalen Spektren mit einem fasergekoppelten Spektrometer (Hersteller Ocean Optics, USA) ausgestattet sein.

Die Probe 11 in der Probenkammer 10 enthält mindestens zwei mit unterschiedlichen Fluoreszenzmarkern markierte Analyte und/oder mindestens einen mit mindestens zwei Fluoreszenzmarkern markierten Analyten. Gegenstand der erfindungsgemäßen Fluoreszenzmessung ist bspw. eine Koinzidenzanalyse der mit den Detektoren 31, 32 erfassten Fluoreszenzemissionen der verschiedenen Fluoreszenzmarker. Dies ist schematisch in Figur 2 illustriert. In der Probe sind bspw. die Analyten A1 und A2 enthalten, die jeweils mit Fluoreszenzmarkern M1 und M2 markiert sind. Die Analyten sind bspw. Paare von Antikörpern und Antigenen, deren Bindungsverhalten untersucht werden soll. Solange die Analyten A1 und A2 nicht aneinander gebunden sind, passieren sie getrennt zu verschiedenen Zeiten das Anregungsvolumen. Die Detektoren 31, 32 liefern zeitlich getrennt Fluoreszenzsignale, die in Figur 2 (links, Mitte) schematisch durch Pfeile P1, P2 symbolisiert werden. Die Fluoreszenzsignale werden unkorreliert zu beliebigen Zeiten gemessen, ein Kor-

relations- oder Koinzidenzsignal G ist nicht ableitbar. Nachdem die Bindung zu einem Analyten A3 erfolgt ist, der die Fluoreszenzmarker M1 und M2 gemeinsam trägt, wird an beiden Detektoren 31, 32 gleichzeitig die Fluoreszenzemission erfasst. Entsprechend ist ein Korrelations- oder Koinzidenzsignal ableitbar (Figur 2, rechts unten).

Umgekehrt kann auch die Zerlegung des Analyten A3 in Teilkomponenten detektiert werden, wie dies bspw. bei der Beobachtung des enzymatischen Abbaus eines zweifach mit Fluoreszenzmarkern gelabelten Substrats von Interesse ist. Allgemein werden mit dem erfindungsgemäßen Messverfahren vorzugsweise alle chemischen Reaktionen oder physikalischen Abläufe erfasst, bei denen eine chemische Bindung zwischen getrennten Analyten hergestellt oder eine vorhandene Bindung aufgeschnitten oder entsprechend eine physikalische Assoziation oder Dissoziation durchgeführt wird. Dem Messverfahren sind alle Analyten (Substanzen) zugänglich, die auf den verschiedenen Seiten der jeweils herzustellenden oder zu trennenden Verbindung mit Fluoreszenzmarkern markierbar sind.

Die Signalerfassung mit den Detektoren und die Korrelationsanalyse erfolgen in an sich von den FCS-Techniken bekannter Weise. Mit den Detektoren erfolgt eine Fluoreszenzmessung in vorbestimmten Zeitfenstern. Die Breite der Zeitfenster wird anwendungsabhängig gewählt. Sie wird vorzugsweise auf die mittlere Aufenthaltsdauer der Analyten im Messvolumen eingestellt. Die Aufenthaltsdauer ist insbesondere von der Molekül- oder Teilchengröße und -beweglichkeit abhängig und kann gemessen oder theoretisch abgeschätzt werden. Die in den Zeitfenstern erfassten Photonenzahlen werden in den beiden Detektionskanälen verglichen. Zur Koinzidenzanalyse erfolgt der Vergleich gleichzeitiger Zeitverläufe. Die Kreuzkorrelationsanalyse ist auf den Vergleich zeitlich versetzter Abläufe gerichtet. Die Korrelationsanalysen werden mit an sich bekannten Al-

gorithmen zur Verarbeitung der Signale der verschiedenen Detektionskanäle durchgeführt.

Auf der Grundlage der Koinzidenzanalyse ist eine Konzentrationsmessung möglich. Aus der Stärke der erfassten Koinzidenzen (Amplitude von Koinzidenzsignalen) wird ein Maß für die Zahl der doppelt markierten Moleküle oder Teilchen in der Probe abgeleitet.

Die mit dem Korrelator 40 durchgeführte Kreuzkorrelations- oder Koinzidenzanalyse der Detektorsignale erfolgt vorzugsweise in bekannter Weise, wie es in WO 99/34195 beschrieben ist. Die in dieser Patentanmeldung offenbarten Einzelheiten zur Signalanalyse werden vollständig durch Bezugnahme in die vorliegende Beschreibung einbezogen.

Es kann insbesondere analog zu dem in WO 99/34195 beschriebenen Verfahren vorgesehen sein, dass während der Fluoreszenzanalyse mittels eines Strahlscanners und/oder eines Probensantriebs zwischen der Probe und der Beleuchtungseinrichtung eine Relativbewegung eingestellt wird. Es erfolgt eine Erhöhung der Fluktuationsbewegungen, die Diffusionszeiten werden niedriger. Das Messvolumenelement kann durch die Probe gescannt werden. Bei Einstellung dieser Relativbewegung ist gegebenenfalls das Zeitfenster der Koinzidenzanalyse anzupassen.

Als Fluoreszenzmarker M1, M2 werden vorzugsweise Fluoreszenzfarbstoffe verwendet, wie sie bspw. aus der Fluoreszenzmikroskopie bekannt sind. Es werden Farbstoffpaare ausgewählt, die bei einer ausgewählten Wellenlänge ähnliche Absorptionsquerschnitte aufweisen und spektral separierbare Fluoreszenzspektren bei hoher Photostabilität besitzen. Als Markerpaare werden bspw. die Farbstoffe Rhodamin Grün/Texas Rot, Fluoresceinderivate (z. B. Alexa 488/Alexa 594) oder molekularbiologische Farbstoffe wie grün fluoreszierende Proteine

(GFP)/rot fluoreszierende Proteine (RFP) verwendet. Anstelle von Farbstoffen oder fluoreszierenden Proteinen können auch andere fluoreszierende Substanzen oder Partikel, z. B. sog. Quantum Dots, als Fluoreszenzmarker eingesetzt werden. Es können auch autofluoreszierende Proteine, wie z.B. GFP, dsRED, autofluoreszierende Biomolekülen, z. B. Tryptophan, Tyrosin, oder Flavine, oder autofluoreszierende organische Molekülen verwendet werden. Das erfindungsgemäße Verfahren kann auch zur Erfassung von Ramanstreuung oder oberflächenverstärkter Ramanstreuung (surface enhanced raman scattering, SERS) ausgelegt sein.

Figur 3 zeigt die spektralen Eigenschaften des Markersystems Rhodamin Grün/Texas Rot. Beide Farbstoffe zeigen eine ähnlich hohe Fluoreszenzphotonenausbeute und eine genügende Lichtstabilität, um die erfindungsgemäß verwendeten Anregungsintensitäten zu tolerieren. Die Spektren (1) und (2) zeigen die Fluoreszenzemissionen von Rhodamin Grün bzw. Texas Rot ( $\mu\text{M}$ -Lösungen) bei einer Anregungswellenlänge von 830 nm. Die Kurve (3) zeigt den Transmissionsverlauf des dichroitischen Spiegels 55. Im Bereich der kürzerwelligen Fluoreszenz (1) erfolgt die Reflexion zum Detektor 31. Die Kurven (4) und (5) zeigen die Transmissionscharakteristik der Filter 56 bzw. 57, die zur weiteren Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses vorgesehen, jedoch kein zwingendes Merkmal der Erfindung sind.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung erfolgt die Anregung der 2-Photonen-Absorptionen bei einer vorbestimmten Anregungswellenlänge, die wie folgt ausgewählt wird. Nach Ermittlung der Anregungsspektren der verwendeten Fluoreszenzmarker (siehe Figur 3) wird für jeden Fluoreszenzmarker die Fluoreszenzphotonenausbeute in Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge ermittelt. Da sich die Anregungsspektren der Fluoreszenzmarker überlappen, ergeben sich auch überlappende Kurvenverläufe der wellenlängenabhängigen Fluoreszenzphotonenaus-



beute. Die optimale Wellenlänge wird entsprechend der Wellenlänge oder dem Wellenlängenintervall gewählt, in dem die Fluoreszenzphotonenausbeuten beider Fluoreszenzmarker im Wesentlichen übereinstimmen oder die Abweichung zwischen den Fluoreszenzphotonenausbeuten weniger als ein vorbestimmtes Verhältnis, z. B. weniger als Faktor 3, beträgt. Dies wird im Folgenden am Beispiel von Fluoreszenzfarbstoffen illustriert.

Die Figuren 4 und 5 illustrieren spektrale Eigenschaften des Markerpaars Rhodamin Grün/Texas Rot. Zur Ermittlung der optimalen Anregungswellenlänge zur 2-Photonen-Anregung wird für jeden Farbstoff ein Anregungsspektrum im Bereich 740 nm bis 900 nm aufgenommen. Die Kurvenverläufe in Figur 4 zeigen ein Anregungsmaximum bei 780 nm für Texas Rot (Kreuze) und bei 850 nm für Rhodamin Grün (Dreiecke). Für die erfindungsgemäßen Fluoreszenzmessungen wird eine Anregungswellenlänge gewählt, bei der beide Farbstoffe mit nahezu gleicher Effizienz anregbar sind und bei der beide Farbstoffe vergleichbar starke Fluoreszenzemissionen zeigen. Die Anregungswellenlänge beträgt beim dargestellten Beispiel 830 nm.

Figur 5 zeigt, dass die Anregung bei 830 nm tatsächlich eine 2-Photonen-Absorption bewirkt. Für beide Farbstoffe wurde getrennt die Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Anregungsleistung gemessen. Für beide Farbstoffe ergibt sich unterhalb der Sättigungsgrenze die für 2-Photonen-Prozesse zu erwartende quadratische Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der eingestrahlten Leistung. Die doppelt logarithmische Darstellung liefert die entsprechende linearisierte Form mit Steigung 2.

Figur 6 zeigt den Verlauf von Autokorrelationskurven, die mit einer Testlösung von Rhodamin Grün in den beiden Detektionkanälen aufgenommen wurden und eine entsprechende Kreuzkorrelationskurve zwischen beiden Detektionskanälen. Alle drei Kurven

verlaufen im wesentlichen gleich. Dies zeigt, dass die Detektionsvolumen identisch bzw. die Detektionsstrahlengänge genau auf das Anregungsvolumen justiert sind. Kreuzkorrelationsmessungen an doppelt markierten (obere Kurve) und einfach markierten (untere Kurve) DNA-Proben sind in Figur 7 illustriert. Als Vorteil des Messverfahrens zeigt sich, dass sich für die nicht-korrelierten Proben Kreuzkorrelationssignale G ergeben, die weniger als 10 % der entsprechenden korrelierten Signale betragen. Damit ist der erfindungsgemäße Aufbau den herkömmlichen 1-Photon-Messungen überlegen.

Figur 8 illustriert eine bevorzugte Anwendung des erfindungsgemäßen Messverfahrens zur Ermittlung von Konzentrationen in der Probe. Es wird die Echtzeitmessung von Enzymkinetiken dargestellt. Ein zweifach markiertes Substrat (DNA-Probe) wird enzymatisch in einzeln markierte Produkte zerlegt. Dementsprechend sinkt die Zahl der erfassten doppelt markierten Moleküle im Zeitverlauf. Mit zunehmender Konzentration des zugesetzten Enzyms (Endonuklease EcoRI) wird der Abfall der Substratkonzentration beschleunigt.

Die in der vorstehenden Beschreibung, den Zeichnungen und den Ansprüchen offenbarten Merkmale der Erfindung können sowohl einzeln als auch in beliebiger Kombination für die Verwirklichung der Erfindung in ihren verschiedenen Ausgestaltungen von Bedeutung sein.

### Patentansprüche

1. Verfahren zur Fluoreszenzmessung an Analyten in einer Probe, wobei die Probe mindestens zwei mit unterschiedlichen Fluoreszenzmarkern markierte Analyte und/oder mindestens einen mit mindestens zwei unterschiedlichen Fluoreszenzmarkern markierten Analyten enthält, wobei die Fluoreszenzmarker spektral verschiedene Fluoreszenzemissionen besitzen, mit den Schritten:

- Beleuchtung der Probe (11) in einem Messvolumen mit einem Laser (20) zur Anregung der Fluoreszenzemission der mindestens zwei Fluoreszenzmarker,
- Detektion der Fluoreszenzemission mit mindestens zwei Detektoreinrichtungen (31, 32), die zur Lichtdetektion in verschiedenen Spektralbereichen entsprechend den spektralen Fluoreszenzeigenschaften der Fluoreszenzmarker ausgelegt sind, und
- Durchführung einer Kreuzkorrelations- und/oder eine Koinzidenzanalyse von Detektorsignalen der Detektoreinrichtungen (31, 32),

**dadurch gekennzeichnet, dass**

die Beleuchtung der Probe im Messvolumen mit maximal einer einzelnen Laserlinie mit einer derart hohen Anregungsintensität erfolgt, dass die Fluoreszenzmarker gemeinsam durch 2-Photonen-Absorptionen angeregt werden.

2. Verfahren gemäß Anspruch 1, bei dem zur Detektion der Fluoreszenzemission eine blendenfreie Abbildung des Lichtes, das vom Messvolumen und von der Umgebung des Messvolumens ausgeht, auf die Detektoreinrichtungen erfolgt.

3. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 2, bei dem als Fluoreszenzmarker Fluoreszenzfarbstoffe, fluoreszierende Proteine, Biomoleküle, organische Moleküle, Quantum Dots oder Marker, die zur Erfassung von Ramanstreuung ausgelegt sind, verwendet werden.

4. Verfahren gemäß Anspruch 3, bei dem als Fluoreszenzmarker Fluoreszenzfarbstoffe verwendet werden, die sich überlappende 2-Photonen-Anregungsspektren und unterschiedliche Fluoreszenzemissionsspektren besitzen.

5. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem die Beleuchtung der Probe mit der Laserlinie mit einer Wellenlänge erfolgt, bei der beide Fluoreszenzmarker im wesentlichen gleiche oder in vorbestimmter Weise voneinander abweichende Fluoreszenzphotonenausbeuten besitzen.

6. Verfahren gemäß Anspruch 1, bei dem eine Koinzidenzanalyse der Detektorsignale erfolgt und aus dem Ergebnis der Koinzidenzanalyse die Konzentration von mehrfach markierten Analyten in der Probe abgeleitet wird.

7. Verfahren gemäß Anspruch 6, bei dem mittels eines Strahlscanners und/oder eines Probensantriebs zwischen der Probe und der Beleuchtungseinrichtung eine Relativbewegung eingestellt wird.

8. Verfahren gemäß Anspruch 6 oder 7, bei dem die Koinzidenzanalyse durch Vergleich der in bestimmten Zeitfenstern erfassten Fluoreszenzsignale der verschiedenen Detektoreinrichtungen (31, 32) erfolgt, wobei die Breite des Zeitfensters im Bereich der mittleren Aufenthaltsdauer der Analyten im Messvolumen eingestellt ist.

9. Vorrichtung (100) zur Fluoreszenzmessung an Analyten in einer Probe, wobei die Probe mindestens zwei mit unterschiedlichen Fluoreszenzmarkern markierte Analyte und/oder mindestens einen mit mindestens zwei Fluoreszenzmarkern markierten Analyten enthält, die umfasst:

- eine Probenkammer (10), in der die Probe angeordnet ist,
- eine Beleuchtungseinrichtung (20), die zur Anregung von Fluoreszenzemission der mindestens zwei Fluoreszenzmarker mit einer einzigen Laserlinie eingerichtet ist,
- mindestens zwei Detektoreinrichtungen (31, 32), die zur Detektion der Fluoreszenzemission in verschiedenen Spektralbereichen ausgelegt sind, und

- ein Korrelator (40) zur Kreuzkorrelations- und/oder Koinzidenzanalyse von Detektorsignalen der Detektoreinrichtungen, **dadurch gekennzeichnet, dass**

die Beleuchtungseinrichtung einen Laser umfasst, der zur Beleuchtung der Probe im Messvolumen mit maximal einer einzelnen Laserlinie mit einer derart hohen Anregungsintensität ausgelegt ist, dass die Fluoreszenzmarker gemeinsam durch 2-Photonen-Absorptionen angeregt werden.

10. Vorrichtung gemäß Anspruch 9, bei dem der Laser bei einer Anregungslinie emittiert, die im roten oder nahinfraroten Spektralbereich liegt.

11. Vorrichtung gemäß Anspruch 9 oder 10, bei der ein Abbildungssystem (50) mit Pinhole-freiem Aufbau vorgesehen ist.

12. Verwendung eines Verfahrens oder einer Vorrichtung gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche zur Messung von Konzentrationen in Probenlösungen oder -suspensionen zur

- Erfassung von molekularen Vorgänge in biologischen Zellen, physikalischen oder chemischen Vorgängen zur Verbindung oder Trennung von Substanzen oder Partikeln, oder molekularen Eigenschaften, wie physikalischen oder chemischen Assoziation oder Bindungen bzw. Spaltungen oder Dissoziationen durch Konzentrationsbestimmung der Analyten,
- Diffusionsanalyse,
- Tripletanalyse mittels Kreuzkorrelation,
- molekularen Helligkeits- und Polarisationsanalyse der Fluorophore, oder
- Analyse- oder Bewertung beim High-Throughput-Screening oder beim Selektionsschritt bei der evolutiven Optimierung von Biomolekülen.

1/9

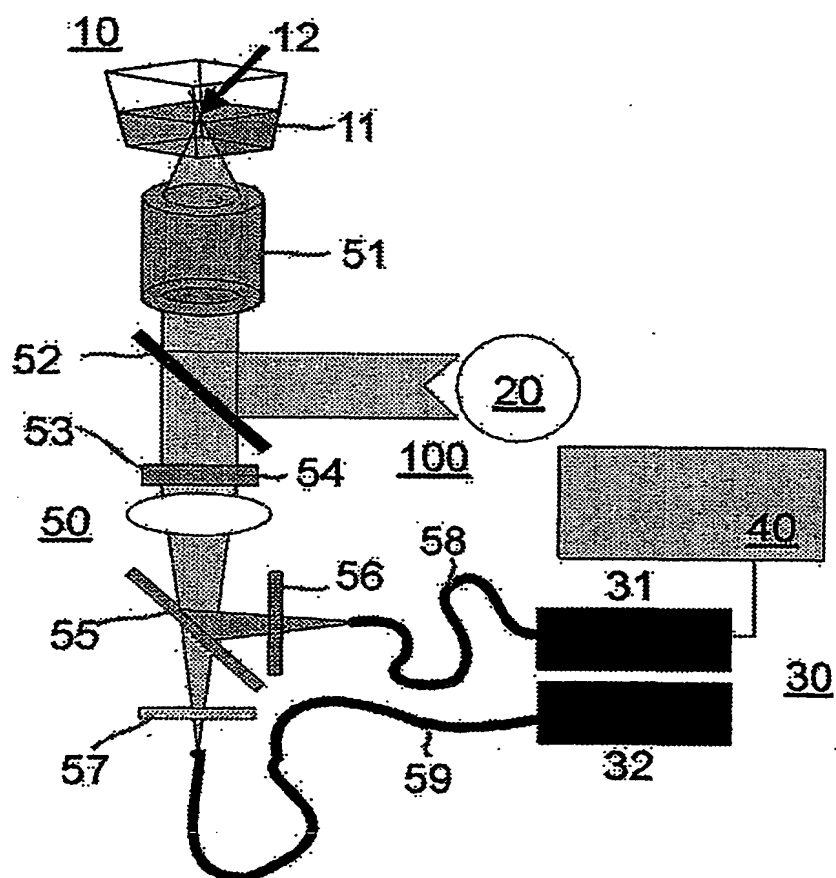


Fig. 1

2/9

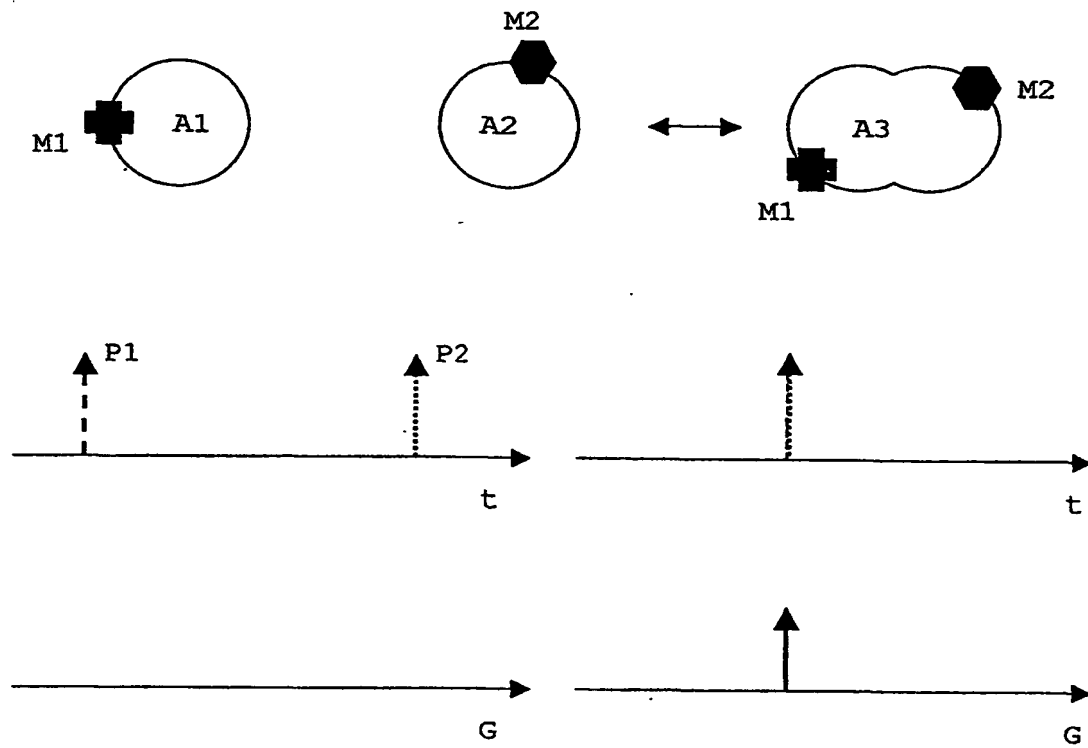


Fig. 2



3/9

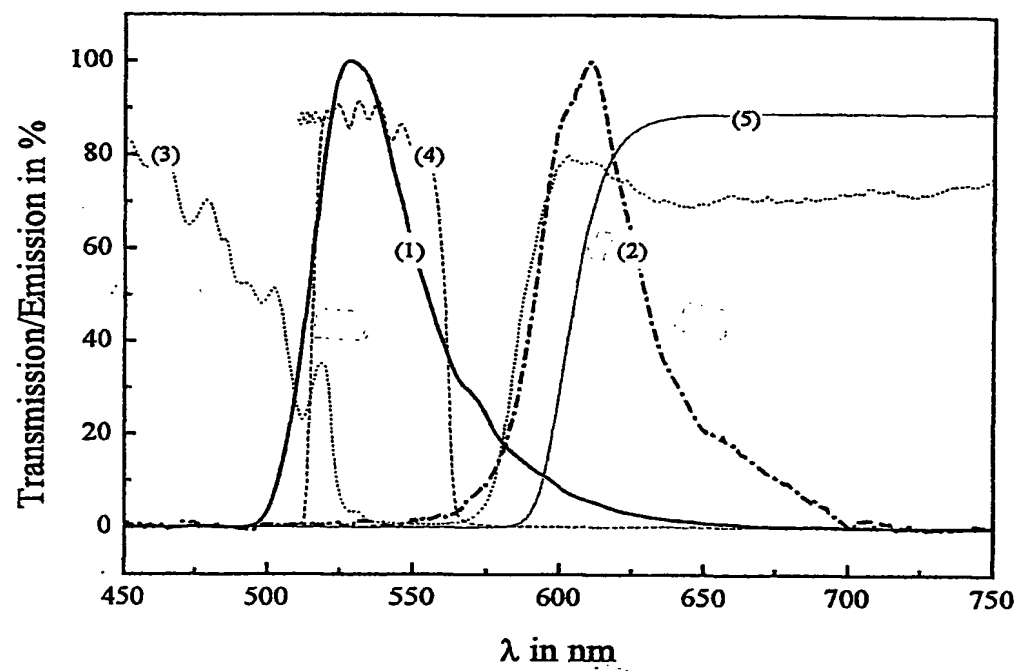


Fig. 3

4/9

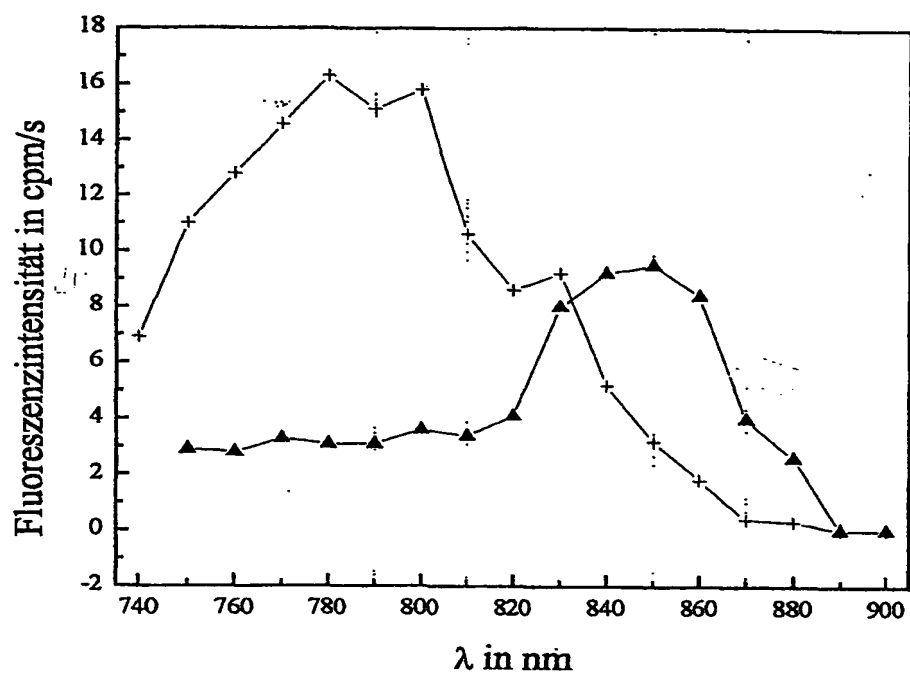


Fig. 4

5/9

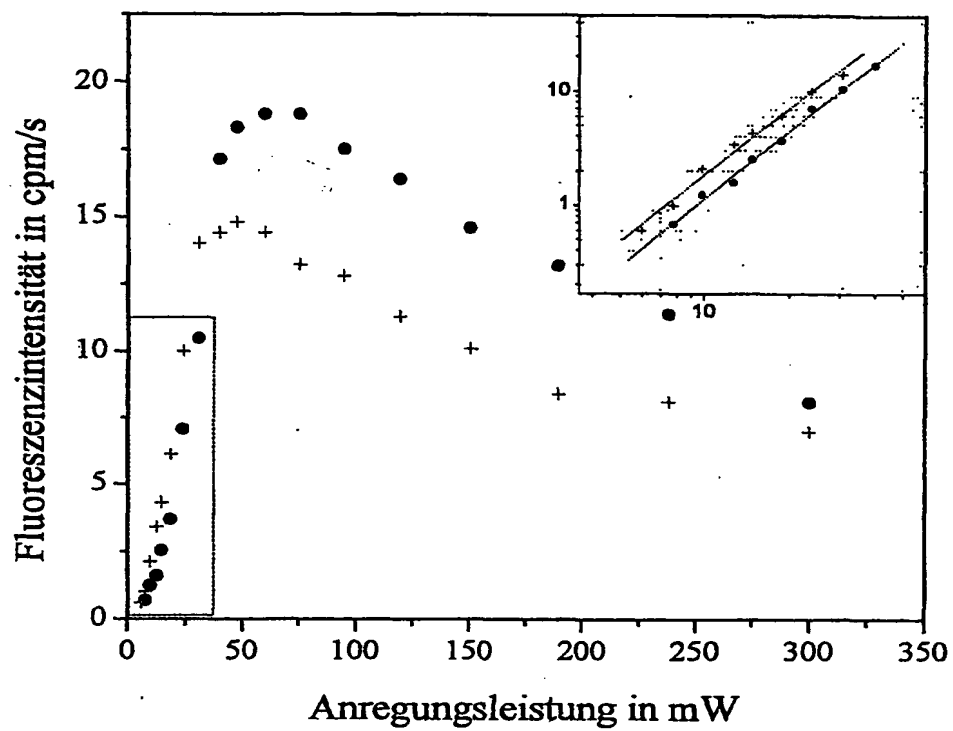


Fig. 5

6/9

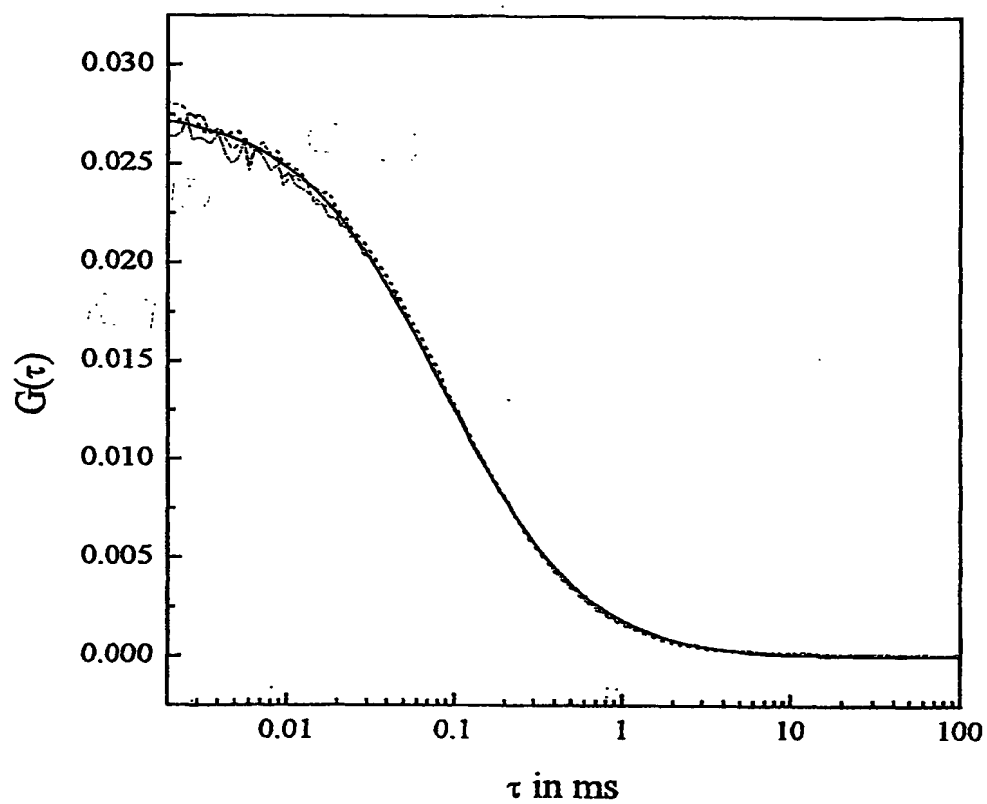


Fig. 6

7/9

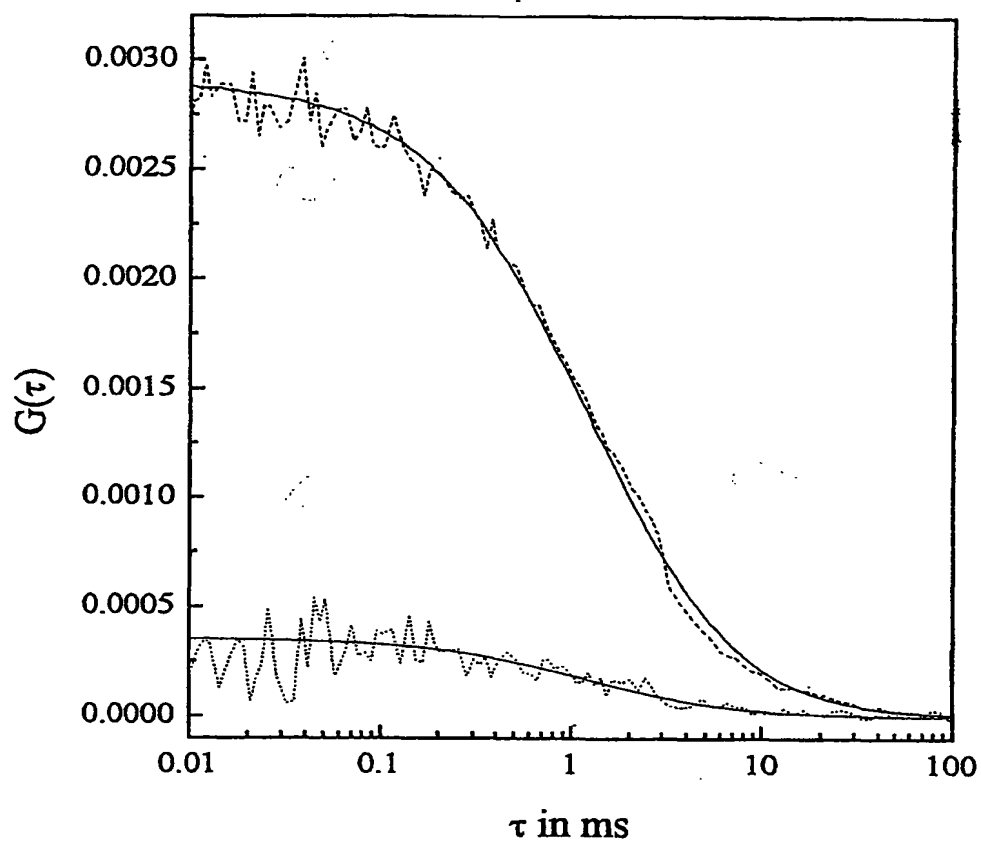


Fig. 7

8/9

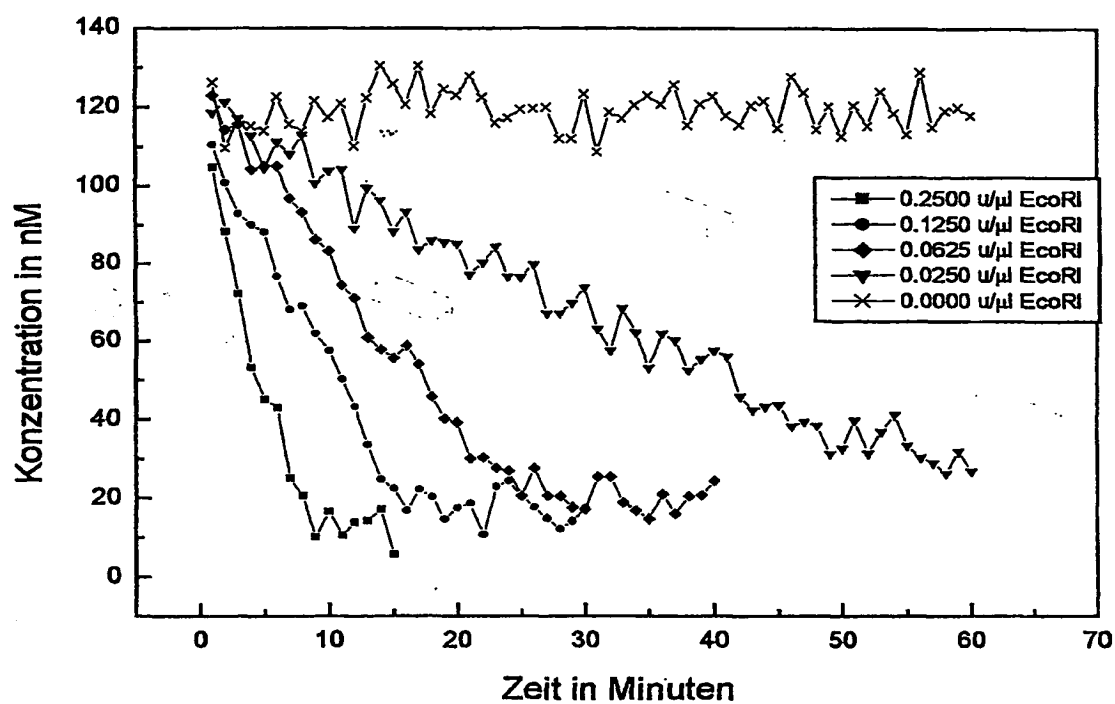


Fig. 8

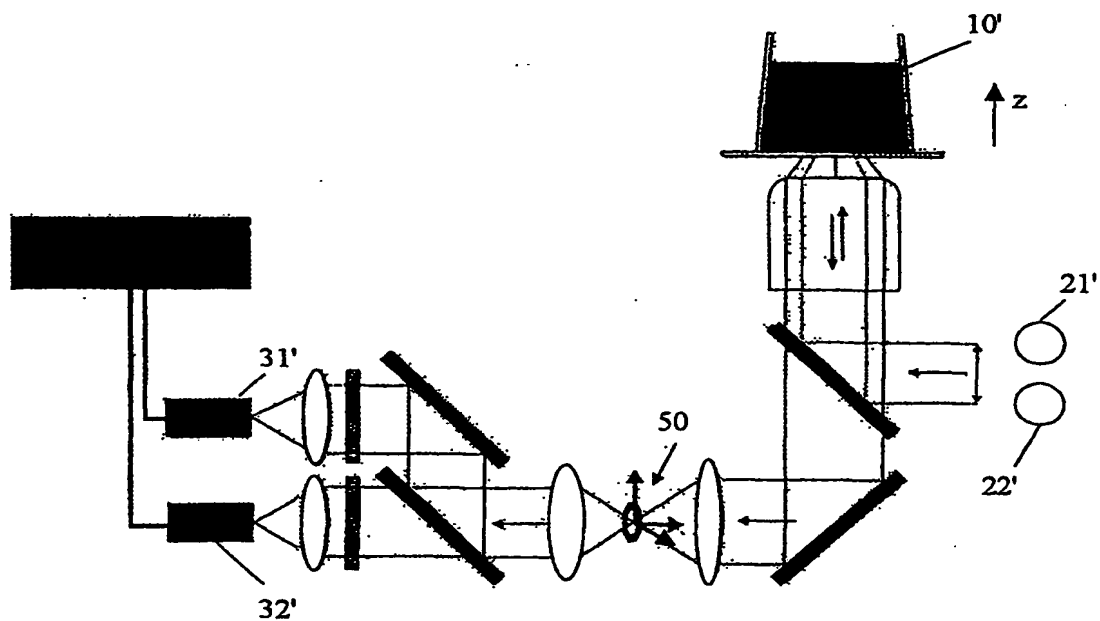


Fig. 9  
(Stand der Technik)

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No  
PCT/EP 01/08328

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 G01N21/64

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N G01J

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

WPI Data, PAJ, EPO-Internal

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	K G HEINZE, A KOLTERMANN, AND P SCHWILLE: "Simultaneous two-photon excitation of distinct labels for dual-color fluorescence crosscorrelation analysis" PROC. NATL. ACAD. SCI., vol. 97, no. 19, 12 September 2000 (2000-09-12), pages 10377-10382, XP002185081 USA the whole document	1-12
P, A	DE 199 35 766 A (FRIEDRICH SCHILLER UNI JENA BU) 1 February 2001 (2001-02-01) column 3, line 29 -column 4, line 23 --- -/-	1-4, 7, 9-11

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 December 2001

Date of mailing of the international search report

27/12/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hoogen, R



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No  
PCT/EP 01/08328

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 99 34195 A (EIGEN MANFRED ;BIESCHKE JAN (DE); DOERRE KLAUS (DE); KETTLING ULRI) 8 July 1999 (1999-07-08) cited in the application page 12, last paragraph; claim 1; figure 11	1,3, 6-10,12
A	P SCHWILLE, U HAUPTS, S MAITI, AND W W WEBB: "Molecular Dynamics in Living Cells Observed by Fluorescence Correlation Spectroscopy with One- and Two-Photon Excitation" BIOPHYSICAL JOURNAL, vol. 77, October 1999 (1999-10), pages 2251-2265, XP002185082 abstract; figure 1	1-3,6,7, 9-12

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int ☐ al Application No  
PCT/EP 01/08328

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 19935766	A	01-02-2001	DE 19935766 A1	01-02-2001
			WO 0109591 A1	08-02-2001
			EP 1117985 A1	25-07-2001
WO 9934195	A	08-07-1999	DE 19757740 A1	08-07-1999
			AT 208037 T	15-11-2001
			DE 59802005 D1	06-12-2001
			WO 9934195 A1	08-07-1999
			EP 1042664 A1	11-10-2000
			US 6200818 B1	13-03-2001

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intu les Aktenzeichen  
PCT/EP 01/08328

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 601N21/64

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 601N 601J

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

WPI Data, PAJ, EPO-Internal

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	K G HEINZE, A KOLTERMANN, AND P SCHWILLE: "Simultaneous two-photon excitation of distinct labels for dual-color fluorescence crosscorrelation analysis" PROC. NATL. ACAD. SCI., Bd. 97, Nr. 19, 12. September 2000 (2000-09-12), Seiten 10377-10382, XP002185081 USA das ganze Dokument	1-12
P,A	DE 199 35 766 A (FRIEDRICH SCHILLER UNI JENA BU) 1. Februar 2001 (2001-02-01) Spalte 3, Zeile 29 -Spalte 4, Zeile 23 --- -/--	1-4,7, 9-11

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benützung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

10. Dezember 2001

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

27/12/2001

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax. (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Hoogen, R

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP 01/08328

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 99 34195 A (EIGEN MANFRED ;BIESCHKE JAN (DE); DOERRE KLAUS (DE); KETTLING ULRI) 8. Juli 1999 (1999-07-08) in der Anmeldung erwähnt Seite 12, letzter Absatz; Anspruch 1; Abbildung 11	1,3, 6-10,12
A	----- P SCHWILLE, U HAUPTS, S MAITI, AND W W WEBB: "Molecular Dynamics in Living Cells Observed by Fluorescence Correlation Spectroscopy with One- and Two-Photon Excitation" BIOPHYSICAL JOURNAL, Bd. 77, Oktober 1999 (1999-10), Seiten 2251-2265, XP002185082 Zusammenfassung; Abbildung 1	1-3,6,7, 9-12

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int. Aktenzeichen  
PCT/EP 01/08328

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
DE 19935766 A	01-02-2001	DE 19935766 A1 WO 0109591 A1 EP 1117985 A1	01-02-2001 08-02-2001 25-07-2001
WO 9934195 A	08-07-1999	DE 19757740 A1 AT 208037 T DE 59802005 D1 WO 9934195 A1 EP 1042664 A1 US 6200818 B1	08-07-1999 15-11-2001 06-12-2001 08-07-1999 11-10-2000 13-03-2001

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**